

Univerzita Karlova v Praze

**Přírodovědecká fakulta**

Katedra parazitologie

**Bakalářská práce**



**Lucia Pohanková**

3. ročník, Biologie

**Opakované expozice slinám flebotomů: imunitní odpověď**

**hostitele a vliv na přenášené patogeny**

Immunity in hosts repeatedly exposed to sand flies and the effect on pathogen transmission

Školitelka: RNDr. Iva Rohoušová, Ph.D.

Praha 2010

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelky,  
s použitím uvedené literatury.

V Praze, dne 8. 8. 2010

Lucia Pohanková

Chtěla bych moc poděkovat své školitelce RNDr. Ivě Rohoušové, Ph.D. za trpělivost a inspirující odborné konzultace při psaní bakalářské práce. Velké poděkování také patří mým skvělým rodičům, přátelům, kolegyním z práce a v neposlední řadě mému příteli a osobnímu kuchaři v jedné osobě. Děkuji za Vaši podporu při mém bakalářském studiu a hlavně v dobách sepisování bakalářské práce.

Přehled použitých zkratk:

BALB/c	inbrední kmen myši vnímavý k leishmaniové infekci
CBA	inbrední kmen myši resistantní k leishmaniové infekci
CGRP	calcitonine gene-related protein
C57BL/6	inbrední kmen myši resistantní k leishmaniové infekci
DTH	delayed type hypersensitivity
EIF	faktor indukující tvorbu erytému (angl. erythema inducing factor)
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
IFN- $\gamma$	interferon gamma
IgG	imunoglobulin G
IgE	imunoglobulin E
IL	interleukin
<i>L.</i>	<i>Lutzomyia</i>
<i>Le.</i>	<i>Leishmania</i>
NK	přírození zabíječi (angl. natural killers)
<i>P.</i>	<i>Phlebotomus</i>
SGS	sonikát slinných žláz, angl. salivary gland sonicate
Th	pomocné T lymfocyty (angl. helper T lymphocyte)

## **Abstrakt**

V průběhu sání infikovaného flebotoma jsou do hostitele inokulovány sliny flebotoma, které mohou silně ovlivnit odpověď imunitního systému. Pokud se jedná o naivního hostitele, průběh infekce bývá většinou horší. U kožní leishmaniózy se léze vyvíjejí dříve, bývají destruktivnější a přetrvávají delší dobu. U hostitelů žijících v endemických oblastech výskytu leishmaniózy a jejich přenašečů bývají hostitelé často vystaveni sání neinfikovaných flebotomů. Pro hostitele jsou sliny antigenní a indukují tvorbu specifické buněčné a protilátkové odpovědi. Tato imunitní odpověď navozuje protektivitu proti leishmaniové infekci a liší se u různých hostitelů. Pokusy byly nečastěji dělané na myším a psím modelu. U lidí jako hostitelů je těžké sledovat vývoj leishmaniové infekce po předchozí expozici, proto se u lidí sledují zejména hladiny protilátek, podle kterých pak můžeme určit míru poštípání flebotomy a riziko přenosu leishmaniózy.

## **Klíčová slova:**

*Lutzomyia*, *Phlebotomus*, DTH, protilátky, IgG,

## **Abstrakt**

During the feeding of infected sand flies are inoculate into the host also sand fly saliva, which can strongly modulate the response of the immune system. If the host is naive, the course of infection is usually worse. In cutaneous leishmaniasis, the lesions developed early, are more destructive and persist longer. The hosts living in endemic areas of leishmaniasis and their vector hosts are often exposed to feeding uninfected sand flies. For host are the saliva antigenic and induces specific cellular and antibody responses. This responses induce the protection against leishmania infection and differ for different hosts, attempts were made most frequently in murine and canine models. In humans, as hosts is difficult to monitor developments leishmania infection after previous exposure, because in humans mainly monitors the levels of antibodies, by which we can determine the degree of sand fly bites and the risk of transmission of leishmaniasis.

## **Keywords:**

*Lutzomyia*, *Phlebotomus*, DTH, antibody, IgG,

## Obsah

1. Úvod	8
2. Vztah: leishmanie - flebotomus – hostitel	9
3. Sliny flebotomů	10
4. Imunitní odpověď hostitele	
4.1. Myši	11
4.2. Psi	17
4.3. Jiné laboratorní modely	20
4.4. Lidé	21
5. Závěr	27
Seznam použité literatury	28

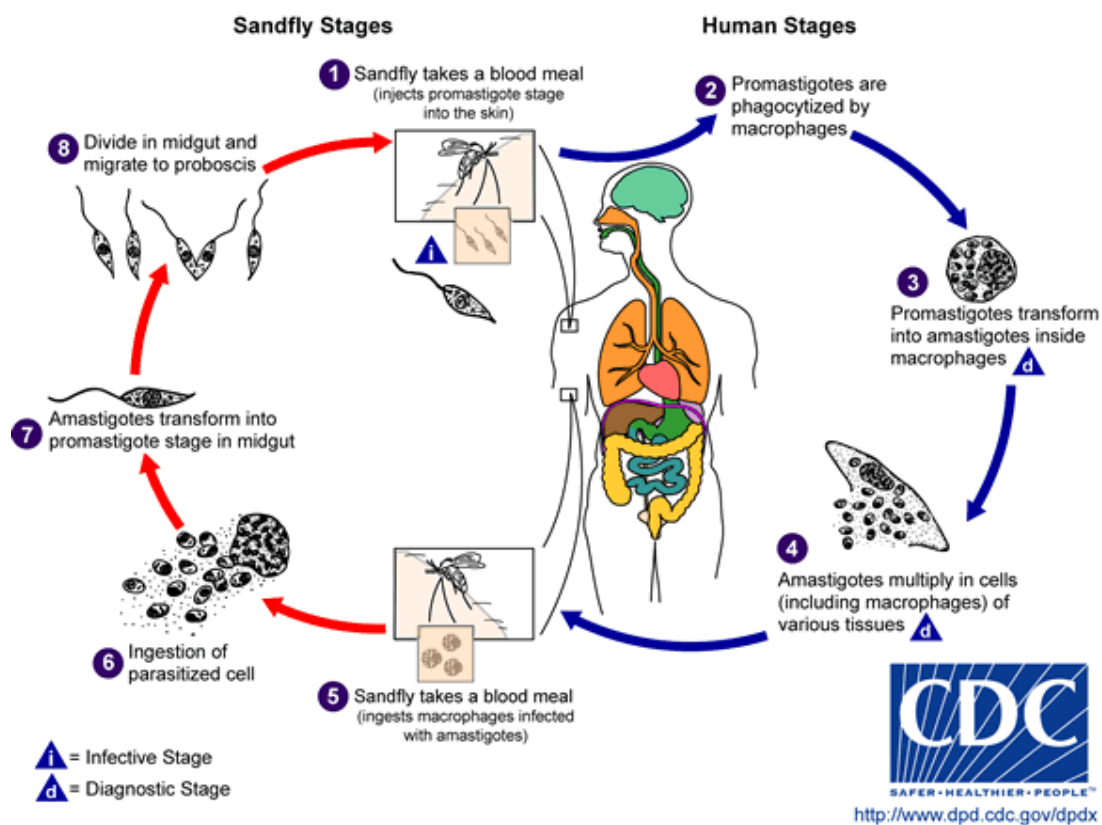
## 1. Úvod

Leishmanióza je protozoární onemocnění, které přenáší flebotomové (Diptera: Psychodidae). Světovou zdravotnickou organizací (WHO) je leishmanióza považována za jednu z deseti nejvýznamnějších infekcí co se týče počtu nakažených.

V předkládané bakalářské práci se snažím shrnout dosavadní publikované poznatky o imunitní odpovědi hostitelů po opakované expozici slinám flebotomů a o možnostech využití této imunitní odpovědi k navození protektivity proti leishmanióze. Jako účinná látka, která by ve vakcíně našla své uplatnění, se jeví sliny nebo jejich jednotlivé složky. Ačkoli sliny zvyšují virulenci leishmanií v prvních fázích infekce, při opakované expozici flebotomům se vytváří specifická buněčná a protilátková odpověď proti slinám, která může navodit určitou protektivitu vůči leishmanióze.



## 2. Vztah leishmanie – flebotomus – hostitel



Obr. 1: životní cyklus leishmanií, (převzato z [www.dpd.cdc.gov](http://www.dpd.cdc.gov))

Pokud na hostiteli saje flebotomus, tak je to vždy samice, pro kterou je krev nezbytná k vývoji vajíček (Beatty a Marquardt, 1996). V průběhu sání na infikovaném hostiteli spolu s krví nasaje i amastigotní stádia leishmanií. Ta se ve střevě flebotoma postupně promění na infekční metacyklické promastigoty. Tito promastigoti jsou při dalším sání inokulováni spolu se slinami do dalšího hostitele. V hostiteli jsou promastigoti pohlceni makrofágy, ve kterých se dále pomnožují a transformují na amastigoty, kteří po uvolnění z makrofága mohou být znovu nasáti dalším flebotomem, čímž se životní cyklus leishmanií uzavírá (Obr. 1) (Sádlová, 1999; Bates, 2007).

### 3. Sliny flebotomů

Dříve se myslelo, že flebotomové jako přenašeči neovlivňují průběh infekce přenášených patogenů, že fungují jako „injekční stříkačka“. Pozdější výzkumy ale ukázaly, že sliny flebotomů mohou velice silně ovlivnit průběh infekce, a že jsou důležité především v samotném počátku, kdy mohou napomoci patogenovi se v hostiteli uchytit v nižší infekční dávce. V anglicky psané literatuře se pro tento fenomén vžil termín „enhancing effect“.

Hlavní funkcí slin flebotomů je především inhibovat projevy hemostáze v místě vpichu a umožnit úspěšné nasátí krve. Látky obsažené ve slinách mají schopnost inhibovat agregaci destiček, vazokonstrikci a koagulaci. Ribeiro a kol. (1988) poprvé popsali ve slinách *Lutzomyia longipalpis* vazodilatační peptid, původně pojmenovaný jako EIF (faktor indukující tvorbu erytému), později přejmenovaný na maxadilan (Lerner a kol., 1991). Maxadilan je pětsetkrát silnějším vazodilátátorem než neuropeptid CGRP, což byl do té doby nejsilnější známý vazodilátátor (Lerner a kol., 1991). Další látkou obsaženou ve slinách *L. longipalpis* je např. apyráza, látka zabraňující agregaci a degranulaci destiček (Ribeiro a kol. 1986). Ve slinách *Phlebotomus papatasi* byla objevena rovněž apyráza (Ribeiro 1987) a další antiagregační látky, jako jsou adenosin a 5'AMP (Ribeiro a kol., 1999). Ve slinách *L. longipalpis* byla detekována hyaluronidázová aktivita (Charlab a kol., 1999). Tento enzym byl nalezen ve slinách dalších flebotomů, konkrétně u druhů *P. papatasi*, *P. duboscqi*, *P. halepensis*, *P. perniciosus* (Černá a kol., 2002). Enzym hyaluronidáza štěpí hyaluronan, který je důležitou složkou extracelulární matrix, tím napomáhá šíření parazita v těle hostitele. Další skupinou proteinů jsou například tzv. D7 proteiny, které jsou rozšířeny u všech krevsajících z řádu dvoukřídlých, flebotomy nevyjímaje (Valenzuela a kol., 2002). O jejich funkci se toho zatím moc neví.

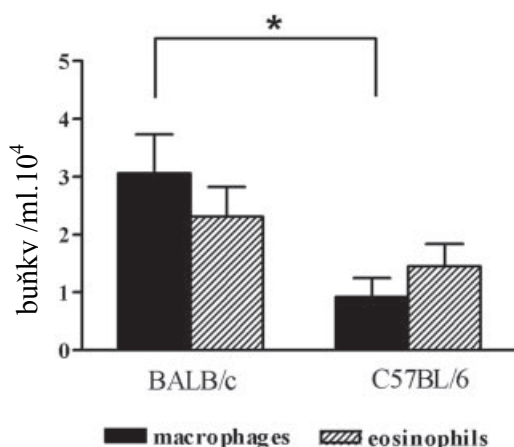
Složení slin flebotomů se výrazně liší nejenom mezi rody *Phlebotomus* a *Lutzomyia*, ale i mezi jednotlivými druhy nebo mezi geograficky oddělenými populacemi v rámci jednoho druhu flebotoma. Mezipopulační variabilita imunosupresivních a anti-hemostatických složek ve slinách *L. longipalpis* mají vliv na průběh přenášené infekce (Warburg a kol., 1994). Sliny kolonie z Brazílie obsahovaly dvojnásobné množství maxadilanu v porovnání s kolonií z kolumbijské oblasti a deseti až čtyřicetinásobné množství v porovnání se slinami flebotomů z Kostariky. Kolonie z Kostariky mají nejvýraznější enhancing efekt na průběh leishmaniové kožní infekce. Naproti tomu efekt slin flebotomů z Brazílie na zhoršení kožních lézí je velice malý (Warburg a kol., 1994). Maxadilan různých populací *L. longipalpis* z Jižní a Střední

Ameriky se liší i v antigenních vlastnostech (Milleron a kol., 2004). U podrodu *Phlebotomus* byly mezipopulační rozdíly zjištěny u *P. duboscqi* a u *P. papatasi* (Volf a kol., 2000).

## 4. Imunitní odpověď hostitele

### 4.1. Myši

Vlastní enhancing efekt slin souvisí s tím, jak na inokulované sliny reaguje imunitní systém hostitele. V těle hostitele působí sliny flebotomů jako chemoatraktanty pro makrofágy, kteří díky tomu do místa inokulace slin doputují dříve a začnou zde fagocytovat leishmanie. Leishmanie se tím dostane dříve do hostitelské buňky. Sliny *P. duboscqi* obsahují složky, které působí chemotakticky na monocyty u myši BALB/c (Anjili et al., 1995). Homogenát slinných žláz *L. longipalpis* vyvolal zvýšenou infiltraci makrofágů a eozinofilů do místa inokulace u myši kmene BALB/c, ale u myši kmene C57BL/6 nebyl pozorován zvýšený příliv makrofágů ani eozinofilů (Obr. 2).



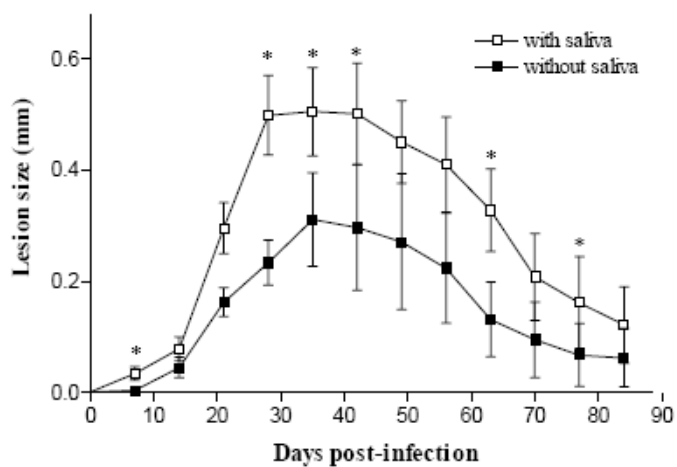
Obr. 2: Signifikantní rozdíl mezi infiltrací makrofágů a eozinofilů, indukovaný inokulací SGSH ze slin *L. longipalpis* (převzato od Teixeira kol., 2005, upraveno)

Odlišné výsledky byly získány u hostitelů po opakovaném sání. U myši opakovaně vystavených účinkům slin *L. longipalpis* došlo k inhibici chemotaktického efektu. Opakovaná expozice vyvolává v těle hostitele tvorbu specifických protilátek, které jsou zřejmě příčinou inhibice infiltraci makrofágů do místa inokulace (Teixeira et al., 2005).

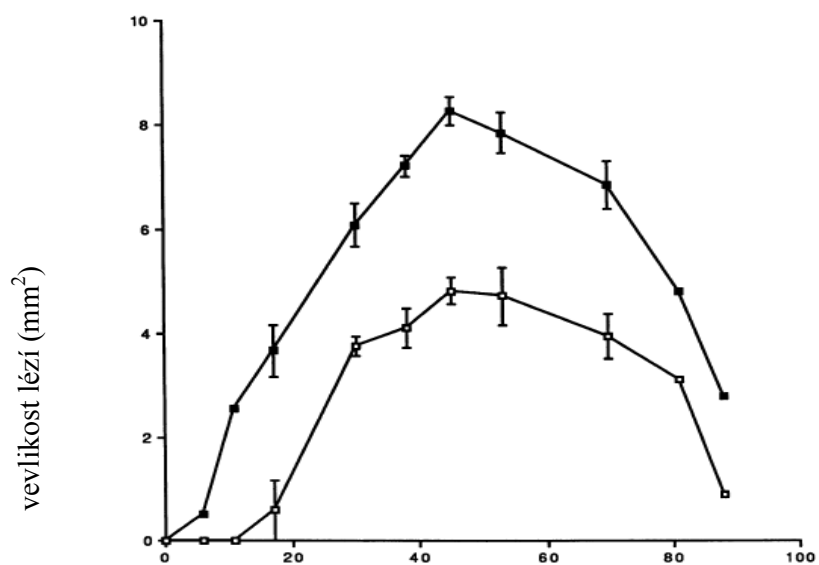
Enhancing efekt slin flebotomů zvyšuje šanci uchycení patogena v hostiteli. Snižuje totiž infekční dávku, potřebnou k vyvolání leishmaniové infekce. Titus a Ribeiro (1988) tento efekt

demonstrovali pokusem na modelu *Leishmania major* a *L. longipalpis*, i když přirozeným přenašečem *Le. major* v přírodě je *P. papatasi* a *P. duboscqi* (Sacks a Kamhawi, 2001). Léze myši, které dostaly leishmanie spolu se slinami flebotomů, byly pět až deset krát větší než léze u myši infikovaných pouze leishmaniemi. Enhancing efekt byl nejvíce patrný u myši, které byly infikovány  $10^1$  nebo  $10^2$  leishmanií (Titus & Ribeiro, 1988). Sliny *P. papatasi* výrazně zhoršují infekci *Le. major* u myši kmene C57BL/6 (Theodos a kol., 1991), které jsou k leishmaniové infekci geneticky rezistentní. U myši kmene BALB/c, které jsou k leishmaniové infekci vnímavé, však není efekt slin *P. papatasi* na průběh infekce *Le. major* tak silný jako u slin *L. longipalpis* (Theodos a kol., 1991).

Samuelson a kol. (1991) prokázali nízkou virulenci *Le. braziliensis braziliensis* na kmen myši BALB/c, které jsou obecně k leishmaniové infekci citlivé. Při inokulaci samotných leishmanií do ucha myši se vyvíjely malé a rychle se hojící léze. Pokud ovšem byly leishmanie inokulovány spolu s lyzátem slinných žláz *L. longipalpis*, u myši se postupně léze zvětšovaly a obsahovaly vysoké množství makrofágů plných amastigotů (Samuelson a kol., 1991). Na průběh infekce měla vliv i dávka leishmanií inokulovaná spolu se slinnými žlázami. Signifikantní vliv na zhoršení průběhu infekce u myši kmene BALB/c byl prokázán u dávek leishmanií vyšších než  $10^4$  (Lima a kol., 1996). V kontrastu s tímto zjištěním jsou již dříve zmiňované výsledky pokusů, při kterých byla použita *Le. major*. K vyvolání infekce a jejímu silnému zhoršení stačila infekční dávka pouhých deseti leishmanií, která byla inokulovaná spolu se slinnými žlázami *L. longipalpis* (Titus a Ribeiro, 1988). Podobně nejednoznačný byl efekt slin *L. whitmani*, které zvětšují kožní léze *Le. braziliensis*, ale vliv slin se neprojevil na dynamice vývoje lézí (Obr. 3) (Bezerra a kol., 2001).



Obr. 3: Vývoj lézí *Le. braziliensis* se slinami *L. whitmani* (převzato z Bezerra a kol., 2001, upraveno)



Obr. 4: vývoj velikosti lézí *Le. major* u myší kmene C57BL/6 ■ - léze myší, které byli těsně před infekcí vystavené sání *L. longipalpis*, □ - léze myší, které nebyly před infekcí vystaveny žádnému sání (převzato z Theodos a kol., 1991, upraveno)

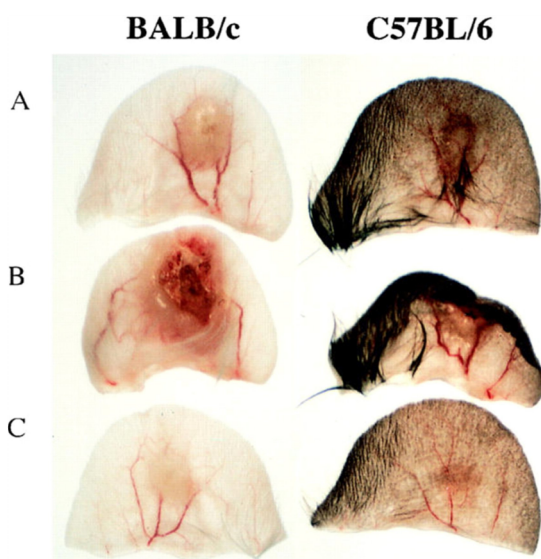
Míra vlivu slinných žláz *L. longipalpis* na zhoršení infekce *L. major* byla prokázána i v případech, kdy leishmanie a slinné žlázy nebyly inokulovány současně. Na myších kmene C57BL/6 sáli neinfikovaní flebotomové, poté se myším do místa sání inokulovala dávka parazitů (Obr. 4). Zhoršující efekt slin na průběh infekce se projevil 6. den, kdy se u myší objevily léze. U kontrolních myší, které nebyly vystaveny předchozímu neinfekčnímu sání těsně před podáním infekční dávky, která obsahovala stejný počet leishmanií, se léze projeví až 17. den (Theodos a kol., 1991).

Lyzát slinných žláz *P. papatasi* významně zhoršuje i vývoj lézí u kmene myší CBA, které jsou jinak vůči *Le. major* resistantní. Toto zhoršení koreluje s inhibicí cytokinů Th1 imunitní odpovědi (IFN- $\gamma$ , IL-12). Naproti tomu se projevuje zvýšená produkce IL-4, což vede k rozvoji Th2 imunitní odpovědi. Změna v produkci cytokinů IL-10 a TGF- $\beta$  nebyla zaznamenána. Lyzát slinných žláz *P. papatasi* přímo zvyšuje expresi IL-4 mRNA i u myší, kterým byla injikována pouze dávka slinných žláz bez patogenu (Mbow a kol., 1998).

V endemických oblastech se počet infikovaných flebotomů obvykle pohybuje do 2% (Silva a kol., 2008, Svobodová a kol., 2009). To znamená, že hostitelé jsou většinou pobodáni neinfikovanými flebotomy. Tato expozice flebotomům vyvolává v těle hostitele specifickou odpověď proti slinám, která může ovlivňovat imunitní odpověď hostitele při dalším setkání s flebotomy, včetně setkání s infikovaným flebotomem (Belkaid a kol., 1998).

První studii, která popisuje navození protektivity proti kožní leishmanióze opakovanou expozicí neinfikovaným flebotomům, publikovali Belkaid a kol. (1998). Dva týdny po sobě byla jedné skupině myší do ucha inokulována dávka slin *P. papatasi*, poté byly myši infikovány *Le. major* spolu se slinami *P. papatasi*. U myší (Obrázek 5C) se projevilo potlačení enhancing efektu slin prostřednictvím protilátek proti SGS: léze byly menší a obsahovaly nižší počty amastigotů. Naproti tomu myši, které se před infekcí nesetkaly s SGS a byla jim inokulována infekční dávka leishmanií spolu s SGS, vykazovaly výrazně zhoršení průběhu infekce (Obrázek 5B) oproti kontrole infikované samotnými leishmaniemi bez slin *P. papatasi* (Obrázek 5A) (Belkaid a kol., 1998). Protektivní efekt navozený opakovanou expozicí hostitele slinám flebotomů byl popsán i na přirozenějším modelu, kdy byly myši nejdříve v průběhu dvou týdnů dvakrát vystaveny neinfekčnímu sání *P. papatasi* a poté na myších sáli *P. papatasi* infikovaní *Le. major*. U kožních lézí došlo k výrazné redukci velikosti v porovnání s kontrolní neexponovanou skupinou. Expozice neinfikovaným flebotomům druhu *P. papatasi* navodila ochranu proti následné infekci *Le. major* (Kamhawi a kol., 2000).

Ochranu proti leishmanióze navozuje imunizace slinami obou rodů flebotomů, *Phlebotomus* i *Lutzomyia*. (Kamhawi a kol., 2000; Silva a kol., 2005, Thiakaki a kol., 2005).

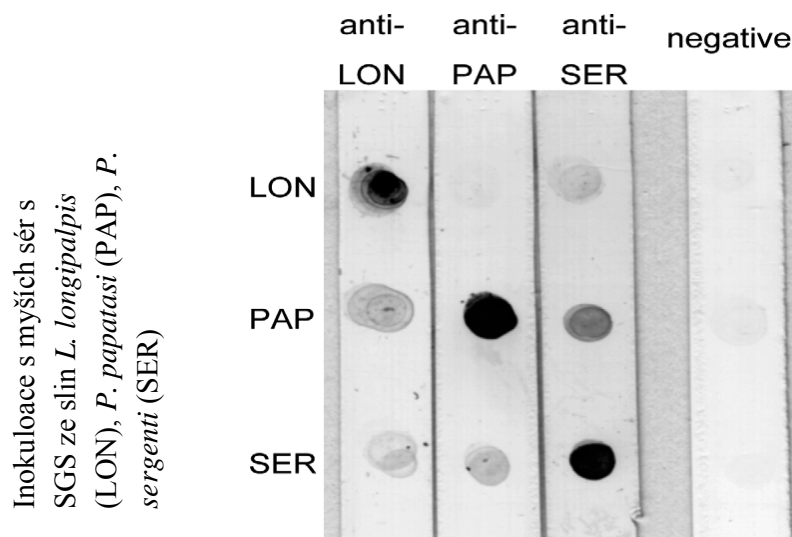


Obr. 5: Kožní léze, které se vyvinuly po 10 týdnech v uších myší, které byly infikovány A) pouze leishmaniemi B) leishmaniemi spolu s SGS *P. papatasi* C) leishmaniemi spolu s SGS po předchozí expozici slinám *P. papatasi* (převzato z Belkaid a kol., 1998)

Protektivita proti kožní leishmanióze souvisí se silnou DTH reakcí v místě vstupu parazita do těla hostitele (Kamhawi a kol., 2000; Valenzuela a kol., 2001). U myší opakovaně imunizovaných SGS ze slin neinfikovaných *P. papatasi* se další inokulace SGS *P. papatasi* projevil vzrůstem průtoku krve, doprovázeným zvýšenou infiltrací monocytů a makrofágů. Tato infiltrace byla nejvýraznější po 24 hodinách po inokulaci SGS (Belkaid a kol., 2000). Silnou infiltraci zánětlivých buněk způsobil SGS i ze slin *L. longipalpis*. U myší, které byly opakovaně vystaveny sání *L. longipalpis* urychlil SGS přísun neutrofilů a makrofágů do místa inokulace. V místě inokulace slin bylo zduření způsobené přílivem neutrofilů a makrofágů patrné i 48 hodin po inokulaci (Silva a kol., 2005). Součástí buněčné odpovědi hostitele na opakovanou expozici při opětovné inokulaci SGS je zvýšená proliferace slezinných buněk (Drahota a kol., 2009). Tento pokus byl popsán u myší imunizovaných *P. sergenti*, kdy buňky sleziny signifikantně zvýšily svou proliferaci po inkubaci s SGS *P. sergenti*. U kontrolních neimunizovaných myší sliny proliferaci inhibovaly. Míra proliferace u myší imunizovaných

*P. sergenti*, se nelišila od kontroly, pokud byly buňky inkubovány s SGS jiného druhu flebotoma, *P. papatasi* nebo *P. arabicus* (Drahota a kol., 2009).

Při opakované expozici slinám flebotomů se tvoří nejenom specifická buněčná odpověď, ale i specifické protilátky proti slinám (Valenzuela a kol., 2001; Silva a kol., 2005). Tvorbu specifických protilátek třídy IgG u myši vyvolávají sliny různých druhů flebotomů, například *P. sergenti*, *P. papatasi* *L. longipalpis* (Rohoušová a kol., 2005; Thiakaki a kol., 2005), *P. perniciosus*, *P. halepensis* (Volf a Rohoušová 2001), *L. intermedia* (de Moura a kol., 2007), *P. ariasi* (Oliveira a kol., 2006). Tvoří se především protilátky třídy IgG, respektive podtřída IgG1. Hladiny podtříd IgG2a a IgG2b se v porovnání s kontrolní skupinou myši, která nebyla vystavena opakovanému sání, nezměnily (Silva a kol., 2005). Protilátky, které se tvoří, jako odpověď proti slinám jsou velice druhově specifické. Imunizace slinami *L. longipalpis* udělila myším částečnou imunitu proti *Le. amazonensis*, původci kožní leishmaniózy (Thiakaki a kol., 2005). Myši imunizované slinami *L. longipalpis* neprojevily zkříženou reakci s antigeny ze slin *P. papatasi* ani *P. sergenti* (Obr. 6). Protilátky myši nejsilněji rozpoznávaly antigeny ze slin flebotomů, kterými byly imunizované (Thiakaki a kol., 2005). Částečná zkřížená reaktivita byla pozorována pouze mezi blízkce příbuznými druhy (Volf a Rohoušová, 2001).



Obr. 6: Metodou dot blot byla testována specifita antigenů proti slinám flebotomů v sérech myši, které byly opakovaně vystaveny sání *L. longipalpis*(anti-LON), *P. papatasi*(anti-PAP), *P. sergenti*(anti-SER). (převzato z Thiakaki a kol., 2005, upraveno)



Ve slinách *P. papatasi* byl charakterizován protein, který v místě inokulace stimuluje silnou DTH reakci. Jeho molekulová hmotnost je 15 kDa a byl pojmenován SP15 (identifikační číslo pro GenBank AF335487) a je příbuzný SL1 proteinu ve slinách *L. longipalpis* (Valenzuela a kol., 2001). Pokusy naznačují, že vakcinace myši tímto proteinem navozuje u myši protektivitu proti *Le. major*. U myši imunizovaných proteinem SP15 byla výrazně potlačena manifestace infekce, což se projevilo výrazným zmenšením velikosti lézí v porovnání s kontrolní skupinou (Valenzuela a kol., 2001). Účinná ochrana proti leishmaniové infekci byla navozena SP15 proteinem ze slin *P. papatasi* u myši, které byly deficitní na B-lymfocyty. Ačkoli tyto myši nemohou vytvářet protilátky, vakcinace SP15 proteinem u nich stimulovala buněčnou odpověď, která byla postačující při potlačení vývoje lézí po infikaci *Le. major* (Valenzuela a kol., 2001). Také ve slinách *Phlebotomus ariasi* byl charakterizován protein, který u myši vyvolával silnou DTH reakci. Jedná se o protein o molekulové hmotnosti 26 kDa, který byl nazván ParSP25 (identifikační číslo pro GenBank AY862995) (Oliveira a kol., 2006). Hlavní součástí slin *L. longipalpis*, která ovlivňuje průběh infekce je pravděpodobně maxadilan (Titus a Ribeiro, 1988; Lerner a kol., 1991). Vakcinace rekombinantním maxadilanem ovlivňuje průběh infekce *Le. major*. Kožní léze, které se objevily u vakcinovaných myši, byly signifikantně menšího rozsahu. Množství parazitů v lézích bylo také výrazně nižší než u kontrolních nevakcinovaných myši (Morris kol., 2001).

Na základě těchto výsledků se nám otevírá otázka, jestli je protektivita proti leishmaniové infekci založená na přítomnosti specifických protilátek. Zdá se, že daleko důležitější roli proti *Le. major* hraje buněčná imunitní reakce vyvolaná slinami (Valenzuela a kol., 2001).

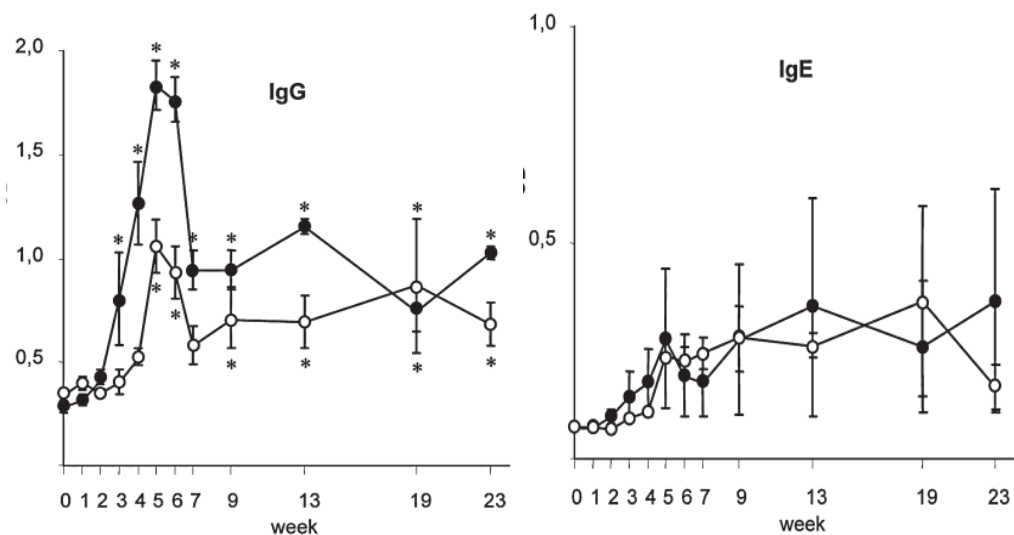
#### **4.2. Psi**

Hlavními rezervoárovými zvířaty v oblastech viscerální leishmaniózy, jejímž původcem jsou leishmanie z komplexu *Le. infantum/donovani*, jsou převážně psi (Deane a Deane, 1955, podle Paranhos a kol., 1993). Jelikož místa vývoje přenašeče jsou obtížně dostupná a možnost snížení počtů flebotomů je problematické, tak se další výzkumy boje s leishmaniózou zaměřily na rezervoárová zvířata.

Poznatky získané na myším modelu nemusí platit u jiných druhů hostitelů. Titus a Ribeiro (1988) poprvé popsali imunomodulační efekt slin flebotomů, který se projevil zhoršením průběhu infekce. Vliv tohoto tzv. enhancing efektu byl poté testován i na jiných modelových zvířatech. Při pokusech se psy Killick-Kendrick a kol. (1994) neprokázali enhancing efekt slin *P. perniciosus* na průběh infekce. Při pokusech s intradermální infekcí *Le. chagasi* se u psů

neprokázal enhancing efekt slin ani u *L. longipalpis*. Průběh infekce a naměřené hodnoty leishmanií ve slezině byly stejné u psů, kterým byla podána infekční dávka leishmanií se slinami jako u skupiny psů, kteří byli infikováni samotnými leishmaniemi (Paranhos-Silva a kol., 2003).

Sliny flebotomů jsou pro psy antigenní a při opakované imunizaci stimulují tvorbu specifické imunitní odpovědi, buněčné i protilátkové. U naivního psa, který se se slinami *P. perniciosus* setkal poprvé až při infekci, nebyly detekovatelné žádné specifické protilátky proti slinám (Killick-Kendrick a kol., 1994). U psů opakovaně vystavených sání vysokému počtu samic *L. longipalpis* byl zjištěn rapidní nárůst protilátek IgG, zejména podtřídy IgG2 s maximem týden po poslední expozici, poté začala hladina protilátek klesat. IgG1 zůstávaly v průběhu celé doby pokusu zhruba na stejné hladině. Druhá skupina psů, která byla vystavena nižšímu počtu samic *L. longipalpis*, vykazovala podobný průběh růstu a poklesu protilátek. Titry protilátek byly ovšem v nižších hladinách. Opakované sání *L. longipalpis* nevyvolává tvorbu specifických IgE protilátek (Obr. 7) (Hostomská a kol., 2008).



Obr. 7: hladiny protilátek IgG a IgE naměřené po sání *L. longipalpis*; ● označují expozici vysokým počtům flebotomů při sání, ○ označují expozici nižším počtům flebotomů při sání (převzato z Hostomská a kol., 2008, upraveno)

V endemických oblastech výskytu *L. longipalpis* na severu Brazílie měřili Gomes a kol. (2007) hladiny specifických protilátek IgG proti slinám různých druhů flebotomů u domácích a divokých psů (pes mekong, *Cerdocyon thous*). Psi z těchto oblastí vykazovali vysoké hladiny protilátek proti slinám *L. longipalpis*.

Pro potvrzení specifity protilátkové odpovědi byla séra testována se slinami *L. intermedia* a *L. whitmani*. *L. whitmani* je minoritně se vyskytujícím druhem v dané oblasti (Soares a kol., 2004a, 2005b; podle Gomes a kol., 2007) Hladiny těchto protilátek byly zanedbatelné (Gomes a kol., 2007). Specifitu protilátek třídy IgG2 při opakované expozici rekombinantním proteinům ze slin *L. longipalpis* potvrzuje ve svých závěrech i Collin a kol. (2009). Psi byli imunizováni rekombinantními proteiny ze slin *L. longipalpis* – LJL143 (identifikační číslo pro databázi GenBank AY445936) a LJM17 (identifikační číslo pro databázi GenBank AF132518). Při opakovaném sání *L. longipalpis* tito imunizováni psi vykazovali vysokou hladinu specifických IgG2 protilátek k proteinům obsažených ve slinách *L. longipalpis* (Collin a kol., 2009).

Nejsilněji rozpoznávanými antigeny ve slinách *L. longipalpis* u psů trpících viscerální leishmaniózou byly proteiny o molekulové hmotnosti 28,6 a 47,3 kDa (Bahia a kol., 2007). Protein o molekulové hmotnosti 28,6 kDa byl identifikován jako LuLo-D7 protein (identifikační číslo pro databázi GenBank AF420274). Je to člen rozsáhlé skupiny D7 proteinů, které jsou běžné i ve slinách jiných druhů krvesajících dvoukřídlých. Druhý antigen o hmotnosti 47,3 kDa byl charakterizován jako Lulo-Yellow protein (identifikační číslo pro databázi GenBank AF132518) (Bahia a kol., 2007). Tento protein je podobný Yellow proteinu u drosofilu (Albert a kol., 1999, podle Bahia a kol., 2007). Při testování sér, získaných od psů experimentálně vystavených opakovanému sání neinfikovaných *L. longipalpis* byla rozeznávána široká škála proteinů ze slin. Byly rozeznávány proteiny o molekulové hmotnosti 66, 55, 45, 37-39, 34 a 25 kDa (Hostomská a kol., 2008). Podobně dopadlo testování psích sér z oblastí přirozeného výskytu *L. longipalpis*. Škála rozeznávaných proteinů ve slinách *L. longipalpis* byla u těchto psů v rozmezí 15 až 65 kDa (Teixeira a kol., 2010). Jako indikátor expozice slinám *L. longipalpis* můžeme použít rekombinantně připravené proteiny, jako nejvhodnější se ukázaly proteiny LJM11, LJL13. Protein LJM11 (identifikační číslo pro databázi GenBank AY445935) je charakterizován jako další ze skupiny Yellow proteinů a jeho molekulová hmotnost je 43,22 kDa. Další z proteinů LJL13 (identifikační číslo pro databázi GenBank AF420274) byl se svou molekulovou hmotností 26,39 kDa přiřazen k D7 proteinům (Valenzuela a kol., 2004).

U kříženců psů, kterým byla inokulována dávka *Le. infantum* společně se slinami *L. longipalpis* byla naměřena silná buněčná odpověď, reprezentovaná vysokou hladinou eozinofilů v krvi. Tato odpověď byla pravděpodobně vyvolána slinami *L. longipalpis*, protože u dalších skupin psů, kteří byli infikováni pouze *Le. infantum*, nebyla zvýšená eozinofilie

naměřena (Paranhos a kol., 1993). Silnou buněčnou odpověď indukovaly rekombinantní proteiny LJL143 a LJM17 připravené ze slin *L. longipalpis*. Jednalo se o buněčnou odpověď opožděného typu, která byla zřetelná po 48 hodinách po inokulaci a projevovala se zčervenáním a velkou infiltrací lymfocytů a makrofágů v místě inokulace (Collin a kol., 2009). U psů imunizovaných proteinem LJM17 se projevila polarizace imunitní odpovědi směrem k Th1 odpovědi, charakterizovaná signifikantní indukcí prozánětlivých cytokinů, zejména IL-12 (Obr. 7) (Collin a kol., 2009). IL-12, který je produkován makrofágy, silně stimuluje NK buňky k produkci IFN- $\gamma$  (Klein a Hořejší, 1997). Zvýšené hladiny IL-12 a IFN- $\gamma$  v místě imunizace napomáhají a podporují udržení zánětlivého prostředí, což aktivuje makrofágy k obraně proti leishmaniové infekci (Sacks a Kamhawi, 2001).

### 4.3. Jiné laboratorní modely

Dalšími experimentálními zvířaty, u kterých se zkoumal vliv slin flebotomů na imunitní odpověď při opakovaném sání byli křečci a morčata. Počet prací na těchto laboratorních modelech je však velmi omezený.

U zlatých křečků (*Mesocricetus aureus*) nebyl pozorován žádný enhancing efekt na průběh leishmaniové infekce (Melo a kol., 2001). Křečkům byla inokulována infekční dávka, která obsahovala různé koncentrace promastigotů *Le. major* spolu s lyzátem slinných žláz *L. longipalpis*. Pouze u křečků, kterým byla inokulovaná spolu se slinami nejvyšší dávka promastigotů,  $10^7$ , byla pozorovatelná zřetelná léze (Melo a kol., 2001). U myši je k vyvolání enhancing efektu, dostačujících pouze 10 leishmanií v infekční dávce podané se slinami *L. longipalpis* (Titus a Ribeiro, 1988). Pomocí DNA plazmidů byly křečkům inokulovány nejčastěji sekretovné proteiny ze slin *L. longipalpis*. U jediného proteinu bylo prokázáno, že navozuje protektivitu proti *Le. chagasi*, která je původcem viscerální leishmaniózy. Křečci preimunizovaní tímto proteinem vykazovali signifikantní DTH reakci, tedy reakci opožděného typu, která se projevila po 48 hodinách zvýšenou infiltrací lymfocytů a makrofágů do místa inokulace. Tímto proteinem je LJM19 (Gomes a kol., 2008), který je nově popsáným proteinem ze slin *L. longipalpis*, se zatím nespecifickou funkcí, jeho molekulová hmotnost je 10,74 kDa (GenBank acc. no. AY438271) (Valenzuela a kol., 2004).

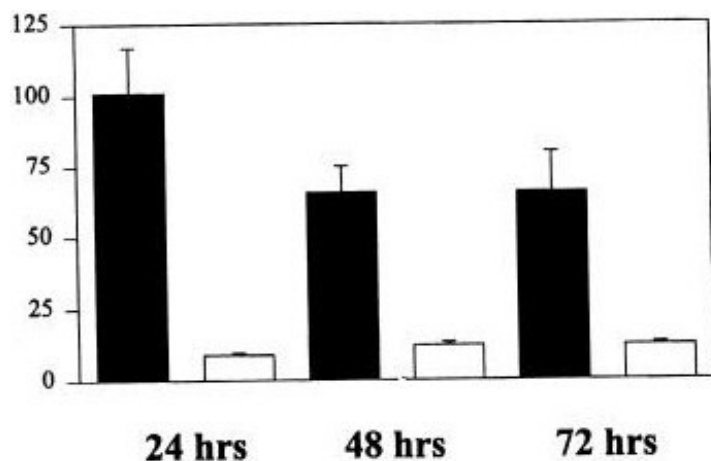
Naivní morčata, která byla vystavena neinfekčnímu sání *L. longipalpis* vykazovala silnou buněčnou odpověď. Tato odpověď byla reprezentována zvýšením počtu bazofilů a eozinofilů v krvi. Tento nárůst se začal projevovat vždy den po expozici, svého vrcholu dosáhl kolem třetího dne a potom postupně klesal až do další expozice. Nejvýraznější byl po první expozici,

po dalších sáních byl průběh stejný, ale hodnota naměřených basofilů a eozinofilů byla nižší. V místě sání se objevilo lehké zčervenání, které však po hodině odeznělo. Nebyla potvrzena reakce opožděného typu (Brown a Rosalsky, 1984).

#### 4.4. Lidé

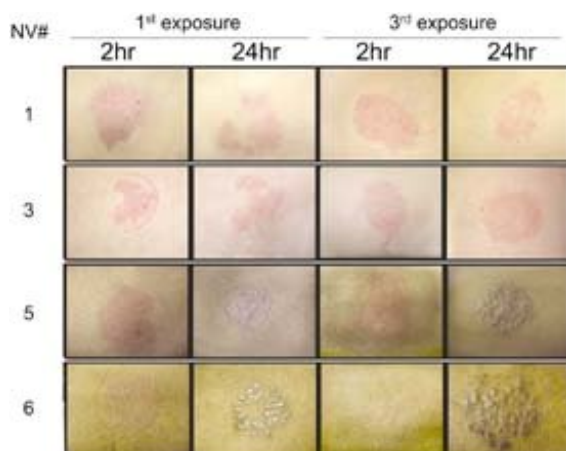
Při opakované expozici flebotomům začne imunitní systém hostitele reagovat na sliny flebotomů, které se při sání dostávají do jeho těla. Dochází tak k buněčné i protilátkové odpovědi na antigeny ve slinách flebotomů (Barral a kol., 2000; Gomes a kol., 2002; Rohoušová a kol., 2005; de Moura a kol., 2007; Clements a kol., 2010).

Při prvním pobodání se vytváří jen slabá buněčná reakce proti slinám ektoparazita. U komárů je známo, že až při opakovaném setkání hostitele se slinami se vytváří opožděný typ reakce (DTH), který dále pak přechází v akutní reakci. Dalšími expozicemi se navozuje určitý typ desenzitizace (Peng a kol., 1996). Pokusem s *P. papatasi* byla prokázána slinami navozená opožděná kožní reakce (Belkaid a kol., 2000). Při sání na naivních jedincích se DTH reakce projevila po 24 hodinách (Obr. 8).



Obr. 8: Průtok krve, který byl naměřen v místě sání *P. papatasi*. ■ - měření v místě probíhající DTH reakce, □ - reprezentují kontrolní místa, kde nebyl naměřen žádný zvýšený průtok krve) (převzato z Belkaid a kol., 2000, upraveno)

Hlavním příznakem DTH reakce probíhající v místě sání bylo zarudnutí v důsledku zvýšeného průtoku krve v podkožních kapilárách. Pokud flebotomové sáli opakovaně na stejném jedinci, tak se už po 6 až 8 hodinách začala projevovat akutní kožní reakce svěděním a zvýšeným průtokem krve. V těchto místech se flebotomové rychleji nasají (Belkaid a kol., 2000). V případě, že byli dobrovolníci vystaveni poštipání druhem *L. longipalpis*, část dobrovolníků vykazovala po dvou hodinách od prvního pobodání akutní kožní reakci a v místě vpichu se jim vytvořili nepravidelné, ale ostře ohraničené hemoragie. Reakce odezněla po 24 hodinách. Při druhém a třetí pobodání *L. longipalpis* měla reakce podobný charakter, ale slabší intenzitu, nebo se dokonce neprojevila vůbec. Druhá část dobrovolníků měla okamžitě po pobodání mírnější projevy akutní reakce a 24 hodin po expozici se objevily malé ztvrdlé pupínky. U této skupiny dobrovolníků mělo pobodání podobný průběh i po druhé a třetí expozici flebotomům (Obr. 9) (Vinhas a kol., 2007).



Obr. 9: léze, které se objevily u dobrovolníků, po expozici *L. longipalpis*; u dobrovolníků 1 a 3 se okamžitě po expozici vyvinula akutní reakce, dobrovolníci 5 a 6 okamžitě po expozici vyvíjeli mírnější formy lézí (převzato z Vinhas a kol., 2007)

Zatímco buněčná imunitní odpověď na sliny flebotomů je u lidí studována spíše sporadicky, o protilátkové odpovědi se toho ví daleko více. Vinhas a kol. (2007) prováděli pokusy, při nichž byli dobrovolníci opakovaně poštipáni neinfikovanými flebotomy *L. longipalpis*. Pouhá jediná expozice vyvolala v dobrovolnících tvorbu protilátek proti slinám *L. longipalpis*. Protilátky proti slinám flebotomů přetrvávaly u opakovaně pobodaných dobrovolníků *L. longipalpis* i po 135 dnech po poslední expozici. Při bližší charakterizaci těchto protilátek se odhalilo, že IgG1 jsou hlavní podtřídou IgG protilátek, které se tvoří jako odpověď na

pobodání *L. longipalpis* (Vinhas a kol., 2007). Pokusů, při kterých by se dobrovolníci nechali opakovaně pobodat flebotomy je však malé množství. Většina krevních sér, u kterých se měří hladiny protilátek proti slinám flebotomů, je získávána od lidí žijících v endemických oblastech leishmaniózy. Ve všech dosud studovaných ohniscích byly v krvi obyvatel prokázány protilátky proti místním druhům flebotomů – v Turecku proti *P. papatasi* a *P. sergenti* (Rohoušová a kol., 2005), v Indii proti *P. papatasi* a *P. argentipes* (Clements a kol., 2010), v Brazílii pak proti *L. longipalpis* a *L. intermedia* (Barral a kol., 2000; Gomes a kol., 2002; de Moura a kol., 2007). U lidí v endemických oblastech byly zjištěny protilátky typu IgE a IgG, zvláště pak jejich podtřída IgG1 (Gomes a kol., 2002). U lidí žijících v Indii, v oblastech výskytu viscerální leishmaniózy, byla zjišťována dynamika protilátek proti slinám *P. argentipes*. Během 30ti denní hospitalizace v nemocnici, kdy lidé spali pod sítěmi proti hmyzu, se hladina protilátek snížila. Po propuštění z nemocnice a návratu do míst, kde se lidé během spánku nijak nechránili, se projevilo signifikantní zvýšení hladiny protilátek proti slinám *P. argentipes*. Podobná dynamika byla sledována také u protilátek proti slinám dalšího místního druhu - *P. papatasi* (Clements a kol., 2010). Při zamezení pobodání flebotomů se hladina protilátek u hostitele sníží, při jeho opětovném styku se slinami flebotomů se však hladina rapidně zvýší. Hladiny protilátek po opětovném styku se slinami jsou mnohdy daleko vyšší než před izolací (Clements a kol., 2010).

Protilátková odpověď lidí na sliny flebotomů je vysoce specifická. U lidí z endemické oblasti výskytu *Leishmania braziliensis* a jejího hlavního vektora *L. intermedia* (Bahia, Brazílie) byly naměřeny výrazně vyšší hladiny protilátek proti slinám *L. intermedia* v porovnání s jednotlivci z oblastí, kde se *L. intermedia* nevyskytuje (de Moura a kol., 2007). Když byla tato séra testována se sonikátem slinných žláz jiného druhu flebotoma - *L. longipalpis* - byla hladina IgG signifikantně nižší v porovnání s hladinou protilátek proti slinám *L. intermedia* (de Moura a kol., 2007). K podobnému závěru došli i Rohoušová a kol. (2005), když testovali séra lidí z endemické oblasti v Turecku. Tato séra vykazovala vysoké hladiny protilátek proti slinám *P. papatasi* a *P. sergenti*, což jsou druhy flebotomů, které se v dané oblasti vyskytují nejhojněji. Tato séra ale už nereagovala se slinami novosvětského druhu *L. longipalpis*, který se v této oblasti nevyskytuje (Rohoušová a kol., 2005). Tyto výsledky ilustrují vysokou mezidruhovou specifitu antigenů ve slinách flebotomů (Rohoušová a kol., 2005; de Moura a kol., 2007). Bylo potvrzeno, že protilátky proti antigenům ve slinách *L. longipalpis* nejsou pozůstatkem po nespecifické polyklonální aktivace IgG vyvolané

antigeny jinými druhy flebotomů či dokonce antigeny jiných druhů členovců, kteří mohli na hostiteli sít (Barral a kol., 2000).

Protilátky proti slinám flebotomů většinou rozpoznávají několik antigenů ve slinách flebotomů. Většina dobrovolníků poštípaných *L. longipalpis* nejsilněji rozeznávala band o molekulové hmotnosti 45 kDa, dalšími nejčastěji rozpoznávanými byly bandy o hmotnosti 44, 43 a 35 kDa. Tyto antigeny *L. longipalpis* byly rozpoznány i po 135 dnech po poslední expozici, ale s mnohem slabší intenzitou (Vinhas a kol., 2007). Většina protilátek lidí z oblasti výskytu *L. longipalpis* však rozpoznávala celé spektrum proteinů v rozmezí mezi 15 a 65 kDa (Teixeira a kol., 2010). Séra lidí z oblasti výskytu *P. papatasi* rozpoznávala přednostně a nejsilněji jediný protein o molekulové hmotnosti 30 kDa, čemuž nasvědčuje, že tento protein je pro lidi hlavním antigenem ve slinách *P. papatasi*. Dalším silně rozpoznávaným proteinem ze slin *P. papatasi* byl protein o hmotnosti 36 kDa. Podle proteomické analýzy slin *P. papatasi* (Valenzuela a kol., 2001) se autoři domnívají, že se zřejmě jedná o protein D7 a apyrázu (Rohoušová a kol., 2005). Ve slinách *P. sergenti* bylo popsáno větší množství antigenů než ve slinách *P. papatasi*, jejichž molekulové hmotnosti kolísaly od 20 do 70 kDa (Rohoušová a kol., 2005).

Podle hladiny protilátek v krvi hostitele můžeme určit, zda a v jaké míře byl hostitel vystaven pobodání flebotomy a předpovědět tak riziko nákazy leishmaniemi. V oblastech s výskytem kožní leishmaniózy byly u pacientů trpících tímto onemocněním naměřeny vysoké hodnoty protilátek třídy IgG proti sonikátu slinných žláz přenašeče *L. intermedia*. Zdraví jedinci pak měli hladiny anti-*L. intermedia* IgG nízké, nezávisle na výsledku kožního testu na leishmaniový antigen (de Moura a kol., 2007). U vzorků z endemické oblasti kožní leishmaniózy v Turecku byly zjištěny vysoké hladiny protilátek třídy IgG proti slinám dvou místních druhů flebotomů, *P. papatasi* a *P. sergenti*. Množství protilátek proti slinám daných druhů flebotomů bylo v širokém rozmezí, přesto jedinci nakažení leishmaniózou vykazovali signifikantně vyšší hladiny protilátek proti slinám přenašeče (*P. sergenti*) v porovnání se zdravými jedinci z dané oblasti. Pokud se porovnali hladiny protilátek proti slinám *P. papatasi*, který v tomto ohnisku není přenašečem, tak mezi oběma skupinami nebyl patrný signifikantní rozdíl (Rohoušová a kol., 2005). Výsledky z obou ohnisek kožní leishmaniózy nasvědčují, že humorální imunitní odpověď proti slinám přenašeče je indikátorem míry pobodání, s čímž je spojeno zvýšené riziko přenosu kožní leishmaniózy (Rohoušová a kol., 2005; de Moura a kol., 2007).



U skupiny dětí žijících v endemické oblasti viscerální leishmaniózy hladina IgG protilátek proti antigenům slinných žláz *L. longipalpis* pozitivně korelovala s DTH reakcí na antigeny *Le. chagasi* (Barral a kol., 2000). U jedinců, kteří v průběhu šesti měsíců prodělali změnu z negativní na pozitivní anti-leishmanovou DTH, byly také zaznamenány zvýšené hladiny protilátek proti slinám *L. longipalpis*. Signifikantní nárůst byl zaznamenán u tříd IgG a IgE (Gomes et al., 2002). Porovnáním výsledků z ohnisek kožní a viscerální leishmaniózy se zdá, že hladiny specifických protilátek v oblastech s výskytem kožní leishmaniózy reflektují míru rizika přenosu leishmaniózy, kdežto v oblastech s výskytem viscerální leishmaniózy hladiny protilátek specifických proti slinám flebotomů odrážejí míru navozené protektivity proti leishmaniové infekci.

Protilátková odpověď na sliny flebotomů se tedy dá využít při odhadu rizika přenosu leishmaniové infekce, ale hlavně jako ukazatel účinnosti různých kampaní zaměřených na expoziční profylaxi. Přestože je protilátková odpověď na sliny flebotomů vysoce specifická, u některých druhů flebotomů dochází ke zkřížené reakci a hostitel pozitivně reaguje i na antigeny těch flebotomů, se kterými se přirozeně setkat nemohl. Tato zkřížená reakce je dána příbuzností mezi flebotomy a jistou antigenní podobností ve složení slin. Jedním ze způsobů, jak zvýšit specifitu měřicí metody, je používání rekombinantních proteinů (Souza a kol., 2010; Teixeira a kol., 2010). U lidí z oblastí výskytu *L. longipalpis* byla prokázána velice nízká zkřížená reakce s antigeny ze slin *L. intermedia*. Ale všechna testovaná séra rozpoznávala proteiny ze slin *L. verrucarum* a *P. perniciosus*, tedy druhů, které se v dané oblasti nevyskytují (Teixeira a kol., 2010). Na základě rozpoznávaných antigenů ve slinách *L. longipalpis* bylo vytvořeno větší množství rekombinantních proteinů. Spolehlivým ukazatelem poštipání flebotomy se ukázal protein s označením LJM17 (identifikační číslo pro databázi GenBank AF132518) o molekulové hmotnosti 45,2 kDa a protein s označením LJM11 (identifikační číslo pro databázi GenBank AY445935) s molekulovou hmotností 43,2 kDa. LJM17 a LJM11 patří do rodiny Yellow proteinů (Valenzuela a kol., 2004). Oba proteiny byly specificky a s velkou intenzitou rozpoznávány lidskými séry z oblastí výskytu *L. longipalpis*. Naopak séra lidí z oblasti výskytu *L. intermedia* tyto rekombinantní proteiny nerozpoznávala (Souza a kol., 2010; Teixeira a kol., 2010). Zároveň hladiny protilátek proti LJM17 a LJM11 pozitivně korelovaly s hladinou IgG proti sonikátu celých slinných žláz *L. longipalpis* (Souza a kol., 2010).

V případě, kdy nejsou antigeny dostupné v rekombinantní podobě, je možné použít metodu popsanou Clement a kol. (2010) jako pre-adsorbed ELISA. Tato metoda spočívá v tom, že se séra nejdříve inkubují se slinami místních druhů flebotomů a až poté se testují proti slinám přenašeče. Tím se ze sér vychytají protilátky, které by mohly zkříženě reagovat a můžeme tak měřit pouze míru expozice přenašeči. Autoři tuto metodu úspěšně otestovali v endemické oblasti viscerální leishmaniózy, kde přenašečem je *P. argentipes*, ale v nezanedbatelném množství se zde vyskytuje i *P. papatasi* (Clements a kol., 2010).

Ochrana proti leishmaniové infekce, která je udělena dřívější expozicí sání flebotomů, vysvětluje, proč v oblastech s endemickým výskytem kožní leishmaniózy domorodí obyvatelé, kteří bývají často poštipáni neinfikováním flebotomy projevují obecně slabší průběh infekce, v porovnání s nově příchozími, jako jsou třeba imigranti nebo turisté (Sacks a Kamhawi, 2001).

## 5. Závěr

Z dosavadních výzkumů se jeví, že možnost vývoje vakcíny, ať už pro lidi, psi nebo myši, není úplně nereálná. Jejím základem budou pravděpodobně sliny nebo jejich součásti.

Opakované expozice slinám flebotomů v těle hostitele vyvolává tvorbu silné buněčné a protilátkové odpovědi. Velký příliv eozinofilů a makrofágů je typický pro buněčnou odpověď opožděného typu (DTH). Všechny tyto buňky indukují a podporují prozánětlivé prostředí, které je pro leishmanie nehostinné. Protilátky specifické proti slinám flebotomů jsou především protilátky třídy IgG. U lidí v oblastech s výskytem kožní leishmaniózy reflektují hladiny protilátek míru pobodání flebotomy, s čímž souvisí riziko přenosu leishmaniózy. V oblastech s výskytem viscerální leishmaniózy hladiny protilátek specifických proti slinám flebotomů odrážejí míru navozené protektivity proti leishmaniové infekci.

Při charakterizaci slin jednotlivých flebotomů byly objeveny některé proteiny, které se svou mírou indukce buněčné a protilátkové odpovědi dají srovnat s celými slinami. Tyto proteiny byly zatím popsány u *L. longipalpis* a *P. papatasi*. Vysoká specifita a odlišnost ve složení slin flebotomů také naznačuje, že pro jednotlivé druhy flebotomů se bude muset být vyvinuta speciální vakcína.

## Seznam použité literatury

- Anjili, C.O., Mbatia, P.A., Mwangi, R.W., Githure, J.I., Olobo, J.O., Robert, L.L., Koech, D.K. (1995). The chemotactic effect of *Phlebotomus duboscqi* (Diptera, Psychodidae) salivary gland lysates to murine monocytes. *Acta Tropica* 60: 97-100.
- Bahia, D., Gontijo, N.F., Leon, I.R., Perales, J., Pereira, M.H., Oliveira, G. (2007). Antibodies from dogs with canine visceral leishmaniasis recognise two proteins from the saliva of *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology Research* 100, 449-454.
- Barral, A., Honda, E., Caldas, A., Costa, J., Vinhas, V., Rowton, E.D., Valenzuela, J.G., Charlab, R., Barral-Netto, M., and Ribeiro, J.M.C. (2000). Human immune response to sand fly salivary gland antigens: A useful epidemiological marker? *American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene* 62, 740-745.
- Bates, P.A., (2007). Transmission of *Leishmaniametacyclic* promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology* 37: 1097-1106.
- Beaty, B.J. and Marquardt, W.C. (1996). The biology of disease vectors. *University Press of Colorado*, 1996, Colorado, ISBN 0-87081-411-7.
- Belkaid, Y., Kamhawi, S., Modi, G., Valenzuela, J., Noben-Trauth, N., Rowton, E., Ribeiro, J., and Sacks, D.L. (1998). Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: Powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. *Journal Of Experimental Medicine* 188, 1941-1953.
- Belkaid, Y., Valenzuela J.G., Kamhawi S., Rowton E., Sacks D.L., Ribeiro J.M.C. (2000). Delayed-type hypersensitivity to *Phlebotomus papatasi* sand fly bite: An adaptive response induced by sand fly? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 6704-6709.
- Bezerra, H. S., Teixeira M. J. (2001). Effect of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) Salivary Gland Lysates on *Leishmania (Viannia) braziliensis* Infection in BALB/c Mice. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 96: 349-351.
- Brown, S.J, Rosalsky J.H. (1984). Blood Leukocyte Response in Hosts Parasitized by the Hematophagous Arthropods *Triatoma protracta* and *Lutzomyia longipalpis*. *American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene* 33, 499-505.

- Clements , M.F., Gidwani K., Kumar R., Hostomska J., Dinesh D.S., Kumar V., Das P., Müller I., Hamilton G., Volfova V., Boelaert M., Das M., Rijal S., Picado A., Volf P., Sundar S., Davies C.R. and Rogers M.E.(2010). Measurement of Recent Exposure to *Phlebotomus argentipes* , the Vector of Indian Visceral Leishmaniasis, by Using Human Antibody Responses to Sand Fly Saliva. *American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene* 82, 801-807.
- Collin, N., Gomes R., Teixeira C., Cheng L., Laughinghouse A., Ward J.M., Elnaiem D.E., Fischer L., Valenzuela J.G., Kamhawi S. (2009). Sand Fly Salivary Proteins Induce Strong Cellular Immunity in a Natural Reservoir of Visceral Leishmaniasis with Adverse Consequences for Leishmania. *PLoS Pathog* 5(5), e1000441.
- Černá, P., Mikes, L., and Volf, P. (2002). Salivary gland hyaluronidase in various species of phlebotomine sand flies (Diptera : Psychodidae). *Insect Biochemistry And Molecular Biology* 32, 1691-1697.
- de Moura, TR; Oliveira, F; Novais, FO, et al. (2007). Enhanced *Leishmania braziliensis* Infection Following Pre-Exposure to Sandfly Saliva. *Plos Neglected Tropical Diseases* 1 a.n.: e84.
- Drahota, J., Lipoldová M., Volf P., Rohoušová I. (2009). Specificity of anti-saliva immune response in mice repeatedly bitten by *Phlebotomus sergenti*. *Parasite Immunology* 31, 766–770
- Gomes, R.B., Brodskyn, U., de Oliveira, C.I., Costa, J., Miranda, J.C., Caldas, A., Valenzuela, J.G., Barral-Netto, M., and Barral, A. (2002). Seroconversion against *Lutzomyia longipalpis* saliva concurrent with the development of anti-Leishmania chagasi delayed-type hypersensitivity. *Journal Of Infectious Diseases* 186, 1530-1534.
- Gomes, R.B., Mendonça IL, Silva VC, Ruas J, Silva MB, Cruz MS, Barral A, Costa CH. (2007). Antibodies against *Lutzomyia longipalpis* saliva in the fox *Cercyon thous* and the sylvatic cycle of *Leishmania chagasi*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 101:127-33.
- Gomes, R., Teixeira C, Teixeira MJ, Oliveira F, Menezes MJ, Silva C, de Oliveira CI, Miranda JC, Elnaiem DE, Kamhawi S, Valenzuela JG, Brodskyn CI. (2008). Immunity to a salivary protein of a sand fly vector protects against the fatal outcome of visceral leishmaniasis in a hamster model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:7845-50.

- Hostomská, J., Rohoušová I., Volfová V., Stanneck D., Mencke N., Volf P. (2008). Kinetics of canine antibody response to saliva of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 8: 443-450.
- Charlab, R., Valenzuela, J.G., Rowton, E.D., and Ribeiro, J.M.C. (1999). Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 15155-15160.
- Kamhawi S., Belkaid Y., Modi G., Rowton E., Sacks D. (2000). Protection Against Cutaneous Leishmaniasis Resulting from Bites of Uninfected Sand Flies. *Science* 290, 1351 – 1354.
- Klein J. and Hořejší V. (1997). Immunology. *Blackwell Science*, ISBN 0-632-04228-1.
- Killick-Kendrick, R., Killick-Kendrick, M., Pinelli, E., Del Real, G., Molina, R., Vitutia, M. M., Cañavate M.C., Nieto J. (1994). A laboratory model of canine leishmaniasis: the inoculation of dogs with *Leishmania infantum* promastigotes from midguts of experimentally infected phlebotomine sandflies. *Parasite* 4, 311-318.
- Lerner, E.A., Ribeiro, J.M.C., Nelson, R.J., and Lerner, M.R. (1991). Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *The journal of biological chemistry* 266, 11234-11236.
- Lima, H.C. and Titus, R.G. (1996). Effects of sand fly vector saliva on development of cutaneous lesions and the immune response to *Leishmania braziliensis* in BALB/c mice. *Infection and Immunity* 64, 5442-5445.
- Mbow, M.L., Bleyenbergh J.A., Hall R.L., Titus R.G. (1998). *Phlebotomus papatasi* Sand Fly Salivary Gland Lysate Down-Regulates a Th1, but Up-Regulates a Th2, Response in Mice Infected with *Leishmania major*. *The Journal of Immunology*, 161: 5571–5577.
- Melo, M.N., Williams P., Tafuri W.L. (2001). Influence of lysates of the salivary glands of *Lutzomyia longipalpis* on the development of a *Leishmania-major*-like parasite in the skin of the golden hamster. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 95, 59- 68.
- Milleron, R.S., Mutebi J.P., Valle S., Montoya A., Yin H., Soong L., Lanzaro G.C. (2004). Antigenic Diversity in Maxadilan, A Salivary Protein from the Sand Fly Vector of American Visceral Leishmaniasis. *American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene* 70, 286-283.

- Morris, R.V.; Shoemaker, C.B.; David, J.R., Lanzaro G.C., Titus R.G. (2001). Sandfly maxadilan exacerbates infection with *Leishmania major* and vaccinating against it protects against *Le. major* infection. *Journal of Immunology* 167: 5226-5230.
- Oliveira, F., Kamhawi, S., Seitz, A.E., Pham, V.M., Guigal, P.M., Fischer, L., Ward, J., and Valenzuela, J.G. (2006). From transcriptome to immunome: Identification of DTH inducing proteins from a *Phlebotomus ariasi* salivary gland cDNA library. *Vaccine* 24, 374-390.
- Paranhos, M., Dossantos, W.C., Sherlock, Í., Oliveira G.G.S., de Carvalho L.C.P. (1993). Development of eosinophilia in dogs intradermally inoculated with sand fly saliva and *Leishmania*-(*Leishmania*) – chagasi - stationary phase promastigotes. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 88: 249-251.
- Paranhos-Silva, M., Oliviera, G.G.S, Reis, E.A., Menezes R.M.C., Fernandes O., Sherlock Í., Gomes R.B.B., Pontes-de-Carvalho L.C., dos-Santos W.L.C.(2003). A follow-up of Beagle dogs intradermally infected with *Leishmania chagasi* in the presence or absence of sand fly saliva. *Veterinary Parasitology* 114: 97-111.
- Peng, Z., Yang M. (1996). Immunologic mechanisms in mosquito Allergy: correlation of skin reactions with specific IgE and IgG antibodies and lymphocyte proliferation response to mosquito antigens. *Ann Allergy Asthma Immunol* 77, 238-244.
- Ribeiro, J.M.C., Rossignol, P.A., and Spielman, A. (1986). Blood-finding strategy of a capillary-feeding sandfly, *Lutzomyia longipalpis*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 83A, 683-686.
- Ribeiro, J.M.C. (1987). Role of saliva in blood-feeding by arthropods. *Annual Review of Entomology* 32, 463-478.
- Ribeiro, J.MC., Vachereau, A., Modi, G.B., Tesh, R.B. (1988). A Novel Vasodilatory Peptide from the Salivary Glands of the Sand Fly *Lutzomyia longipalpis*. *Science* 243, 212-214.
- Ribeiro, J.M.C., Katz, O., Pannell, L.K., Waitumbi, J., and Warburg, A. (1999). Salivary glands of the sand fly *Phlebotomus papatasi* contain pharmacologically active amounts of adenosine and 5'-AMP. *Journal Of Experimental Biology* 202, 1551-1559.
- Rohoušová, I., Ozensoy, S., Ozbek, Y., and Volf, P. (2005). Detection of species-specific antibody response of humans and mice bitten by sand flies. *Parasitology* 130, 493-499.

- Sacks, D., Kamhawi S. (2001). Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annu. Rev. Microbiol.*,55, 453–483.
- Sádlová, J. (1999). The life history of *Leishmania* (kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Acta Societatis Zoologicae Bohemicae* 63, 331-366.
- Samuelson, J., Lerner E., Tesh R., Titus R. (1991). A Mouse Model of *Leishmania braziliensis* Infection Produced by Coinjection with Sand Fly Saliva. *Journal Of Experimental Medicine* 173, 49-54.
- Silva, F., Gomes, R., Prates, D., Miranda, J.C., Andrade, B., Barral-Netto, M., and Barral, A. (2005). Inflammatory cell infiltration and high antibody production in BALB/c mice caused by natural exposure to *Lutzomyia longipalpis* bites. *American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene* 72, 94-98.
- Silva, E.A., Andreotti, R., Dias, E.S., Barros, J.C., Brazuna, J.C. (2008). Detection of *Leishmania* DNA in phlebotomines captured in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Exp Parasitol* 119:343-348.
- Souza, A.P., Andrade, B.B., Aquino, D., Entringer, P., Miranda, J.C., Alcantara, R., Ruiz, D., Soto, M., Teixeira, C.R., Valenzuela, J.G., de Oliveira, C.I., Brodskyn, C.I., Barral-Netto, M., Barral, A. (2010). Using Recombinant Proteins from *Lutzomyia Longipalpis* Saliva to Estimate Human Vector Exposure in Visceral Leishmaniasis Endemic Areas. *PLoS Negl Trop Dis* 4(3): e649
- Svobodová, M., Alten, B., Zídková, L., Dvořák, V., Hlavačková, Myšková, J., Šeblová, V., Kasap, O.E., Belen, A., Votýpka, J., Volf, P. (2009). Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* transmitted by *Phlebotomus tobbi*. *International Journal for Parasitology* 39, 251-256.
- Teixeira, C.R., Teixeira, M.J., Gomes, R.B.B., Santos, C.S., Andrade, B.B., Raffaele-Netto, I., Silva, J.S., Guglielmotti, A., Miranda, J.C., Barral, A., Brodskyn, C. and Barral-Netto, M. (2005). Saliva from *Lutzomyia longipalpis* induces CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 expression and macrophage recruitment. *Journal of Immunology* 175: 8346-8353.
- Teixeira, C.R., Gomes, R., Collin, N., Reynoso, D., Jochim, R., Oliveira, F., Seitz, A., Elnaïem, Dia-E., Caldas, A., de Souza, A.P., Brodskyn, C.I., de Oliveira, C.I., Mendonça, I., Costa, C.H.N., Volf, P., Barral, A., Kamhawi, S., Valenzuela, J.G. (2010). Discovery of Markers of Exposure Specific to Bites of *Lutzomyia longipalpis*, the Vector of *Leishmania infantum* chagasi in Latin America. *PLoS Negl Trop Dis* 4(3): e638



- Theodos, C.M., Ribeiro, J.M.C., and Titus, R.G. (1991). Analysis of enhancing effect of sand fly saliva on *Leishmania* infection in mice. *Infection and Immunity* 59, 1592-1598.
- Thiakaki, M., Rohoušová I., Volfová, V., Volf, P., Chang, K.P., Soteriadou, K. (2005). Sand fly specificity of saliva-mediated protective immunity in *Leishmania amazonensis*-BALB/c mouse model. *Microbes Infect.* 7: 760-766.
- Titus, R.G. and Ribeiro, J.M.C. (1988). Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. *Science* 239, 1306-1308.
- Valenzuela, J.G., Belkaid, Y., Garfield, M.K., Mendez, S., Kamhawi, S., Rowton, E.D., Sacks, D.L., and Ribeiro, J.M.C. (2001). Toward a defined anti-*Leishmania* vaccine targeting vector antigens: Characterization of a protective salivary protein. *The Journal of Experimental Medicine* 194, 331-342.
- Valenzuela, J.G., Charlab, R., Gonzalez, E.C., de Miranda-Santos, I.K.F., Marinotti, O., Francischetti, I.M.B. (2002). The D7 family of salivary proteins in blood sucking diptera. *Insect Molecular Biology* 11: 149-155.
- Valenzuela, J.G., Garfield, M., Rowton, E.D., Pham, V.M. (2004). Identification of the most abundant secreted proteins from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*, vector of *Leishmania chagasi*. *Journal of Experimental Biology* 207: 3717-3729.
- Vinhas, V., Andrade, B.B., Paes, F., Bomura, A., Clarencio, J., Miranda J.C., Báfica, A., Barral, A., Barral-Netto, M. (2007). Human anti-saliva immune response following experimental exposure to the visceral leishmaniasis vector, *Lutzomyia longipalpis*. *European Journal of Immunology* 37: 3111-3121.
- Volf, P., Tesařová, P., Nohýnková, E. (2000). Salivary proteins and glycoproteins in phlebotomine sandflies of various species, sex and age. *Medical and Veterinary Entomology* 14, 251-256.
- Volf, P. a Rohoušová, I. (2001). Species-specific antigens in salivary glands of phlebotomine sandflies. *Parasitology* 122, 37-41.
- Warburg, A., Saraiva, E., Lanzaro, G.C., Titus, R.G., Neva, F. (1994). Saliva of *Lutzomyia longipalpis* sibling species differs in its composition and capacity to enhance leishmaniasis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 345: 223-230.